

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CLINICHE EFARMACO -
TOSSICOLOGICHE VETERINARIE**

**INDIRIZZO PATOLOGIE DELL'APPARATO LOCOMOTORE DEGLI
ANIMALI DOMESTICI**

Studio sulla possibilità d'impiego di un nuovo *Scaffold* in Titanio per la riparazione delle gravi perdite di sostanza ossee: valutazioni preliminari

Il Coordinatore del Corso di Dottorato
Ch.mo Prof. Paolo Ciaramella

Il Docente guida:
Ch.mo Prof. Luigi Navas

Dottorando:
Dr.ssa Federica Miele

DOTTORATO DI RICERCA XXVI CICLO
2011-2014

Sommario

ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	5
RIPARAZIONE DEL TESSUTO OSSEO IN SEGUITO ALLE GRAVI	
PERDITE DI SOSTANZA	8
Fisiologia del tessuto osseo	8
Il processo riparativo del tessuto osseo	10
Le gravi perdite di sostanza a carico del tessuto osseo:.....	12
soluzioni offerte dall'ingegneria tissutale	12
INGEGNERIA TISSUTALE E SCAFFOLD	14
MATERIALI PER SCAFFOLD	17
Ceramiche	18
Polimeri Sintetici	19
Materiali Compositi	21
Metalli	22
SCAFFOLD IN TITANIO	24
SCOPO DELLA TESI	28
MATERIALI E METODI	29
Scaffolds in titanio per lo studio: fabbricazione e proprietà	29
Preparazione degli scaffolds da impiantare	34
Procedura sperimentale	38
RISULTATI	44
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	60
BIBLIOGRAFIA	63

ABSTRACT

Orthopedic tissue engineering offers alternative strategies for the restoration of damaged bone tissue anatomy. Recent researches applied to the field of tissue engineering are directed to the improvement of artificial supports defined as "scaffolds". They are highly sophisticated aids, designed to facilitate attachment, adhesion and cellular distension, and thus to improve deposition of new bone, which can colonize or replace the artificial implant, over time.

The purpose of this study was to evaluate the healing processes of bone tissue after the implantation of a new scaffold made up of titanium, in a sheep experimental model. The evolution was evaluated firstly by means of radiographic and tomographic studies, and then through microradiographic and histological evaluations.

Two scaffolds with different porosity were implanted in six sheep, belonging to Bergamasca breed, at the level of the right tibia. These scaffolds were associated with silicone stabilized tricalcium phosphate and fibrin glue or with the adjunction of mesenchymal stem cells (MSC). Radiographic and tomographic scans were performed immediately after surgery and after 9 months. After euthanasia, tibias were explanted for histological and microradiographic studies.

At the first radiographic evaluation, a good positioning of the scaffold was confirmed in all subjects. At the 9 months evaluation, excellent integration of the scaffold within the bone, in absence of osteolysis, abnormal periosteal reaction and any inflammatory manifestation, was observed in all subjects. The tomographic examination showed artifacts caused by the titanium.

Microradiographic and histological studies showed excellent osteointegration and induction of new-bone formation in all subjects.

The obtained results show that the biomaterial used did not produce, under the described circumstances, adverse reactions related to the component, infections or osteolysis.

This study has to be considered as a preliminary one, since it included a limited number of cases. Further studies might be able to provide more reliable information concerning the use of scaffolds associated with MSC and silicone stabilized tricalcium phosphate and the level of osteointegration of this prosthetic aid.

INTRODUZIONE

L'ingegneria dei tessuti rappresenta una nuova area di ricerca che fa riferimento ai principi di base della biologia, delle scienze ingegneristiche e della medicina rigenerativa, offrendo nuove soluzioni a vecchi problemi; relativamente al nostro studio, l'ingegneria tissutale ortopedica offre strategie alternative per il ripristino del tessuto osseo danneggiato.

In questo approccio, il tessuto osseo viene generato dalle cellule osteogeniche, che sostituiscono il tessuto mancante con l'aiuto di uno *scaffold*.

Il suddetto impianto ha la funzione di supportare la fisiologica rigenerazione tissutale conseguente a lesioni e perdite di sostanza, garantendo la riacquisizione della proprietà meccaniche e strutturali tipiche di una determinata regione anatomica.

La ricerca ha compiuto dei “passi da gigante” nell'ambito della riparazione dei difetti ossei ed articolari, anche grazie all'utilizzo dei biomateriali, che sono stati definiti come “materiali per i quali si prevede una interfaccia con i sistemi biologici al fine di valutare, trattare, migliorare o sostituire qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo umano” (II International Consensus Conference on Biomaterials, Chester, Great Britain 1991), e che vengono utilizzati per la realizzazione di impianti e dispositivi biomedici capaci di promuovere la sostituzione di tessuti e organi compromessi da malattie, traumi o invecchiamento.

Le recenti ricerche applicate al campo dell'ingegneria tissutale sono rivolte al miglioramento dei supporti artificiali definiti “*scaffold*”, costituiti da biomateriali e capaci di stimolare la proliferazione cellulare sia in vitro che in vivo.

Particolare attenzione viene posta nei confronti delle gravi perdite di sostanza a carico del tessuto osseo, per le quali risulta difficoltosa o impossibile la riparazione fisiologica, che necessita di un apporto ematico adeguato e di un ambiente meccanicamente stabile per la deposizione del tessuto osseo.

In questi casi le cellule “autoctone”, adibite alla rigenerazione del tessuto leso, hanno bisogno di una guida per poter compiere il proprio lavoro; tale supporto può essere offerto loro dallo *scaffold*, la cui struttura deve garantire alle cellule un substrato ottimale cui aderire e deve assicurare uno spazio adeguato per la crescita del tessuto neoformato.

Una volta impiantati, gli *scaffolds* possono essere riassorbiti mediante processi metabolici oppure rimanere in loco e continuare a fornire un supporto meccanico, come nel caso degli *scaffolds* costituiti da metalli porosi, che includono il titanio; questi ultimi sono dotati di caratteristiche peculiari, rappresentate dalla resistenza alla corrosione, dalla biocompatibilità e dalla notevole resistenza alle sollecitazioni meccaniche.

Lo *scaffold* ideale risulta dotato di una struttura tridimensionale ad elevata porosità, costituita da pori interconnessi, capace di garantire proprietà meccaniche e strutturali compatibili con quelle del tessuto osseo.

Le caratteristiche di questi impianti sono variabili poiché molteplici sono i materiali utilizzati nella realizzazione degli stessi; la scelta del materiale idoneo

allo scopo è strettamente legata alle esigenze del tessuto cui il supporto è rivolto.

[1]

RIPARAZIONE DEL TESSUTO OSSEO IN SEGUITO ALLE GRAVI PERDITE DI SOSTANZA

Fisiologia del tessuto osseo

La componente cellulare del tessuto osseo è costituita da cellule osteoprogenitrici, osteoblasti, osteoclasti e osteociti.

Tali elementi cellulari sono in grado di regolare il continuo rimodellamento, la riparazione e la rigenerazione tissutale.

Risulta fondamentale anche il contributo delle cellule endoteliali nel provvedere all'apporto di nutrienti e ossigeno, necessari al metabolismo cellulare, e all'allontanamento dei cataboliti.

Le **cellule progenitrici** si localizzano sulle superfici libere delle ossa, a livello dello strato più interno del periostio, riccamente vascolarizzato. Sono inoltre localizzate a livello del tessuto connettivo lasso che riveste le cavità interne dell'osso, l'endostio, in vicinanza dei capillari sanguigni.

Le cellule osteoprogenitrici sono dotate di capacità proliferativa che si manifesta in modo particolare durante l'accrescimento corporeo, ma che si mantiene anche durante la vita adulta; il differenziamento delle cellule preosteoblastiche in osteoblasti maturi avviene grazie allo stimolo di numerosi fattori, principalmente il paratormone (PTH), l'ormone della crescita (GH) e il transforming growth factor-beta (TGF- β).

Gli **osteoblasti** sono le cellule deputate alla sintesi della matrice extracellulare dell'osso ed alla sua mineralizzazione; essi risultano collegati tra loro e con gli osteociti limitrofi mediante giunzioni serrate (gap junctions) attraverso le quali si

verifica uno scambio di molecole segnale capaci di regolare l'attività metabolica e la deposizione della matrice ossea.

Gli **osteociti** rappresentano le cellule tipiche dell'osso maturo, responsabili del suo mantenimento, ma anche capaci di “innescarne” il rimaneggiamento.

Sono cellule terminali, con una propria autonomia di vita, regolata da meccanismi endocrini.

Gli **osteoclasti** sono cellule preposte al riassorbimento osseo; non sono cellule autoctone del tessuto osseo, in quanto non appartengono alla linea che deriva dalle cellule osteoprogenitrici. I preosteoclasti, infatti, originano nel midollo osseo ematopoietico dalla stessa linea differenziativa dei monociti; i precursori sono trasportati dal torrente circolatorio fino alle sedi in cui avvengono i processi di riassorbimento osseo. Ivi giunti, migrano nel tessuto e si fondono insieme originando gli osteoclasti attivi; questi elementi sinciziali sono capaci di dissolvere la componente minerale dell'osso e di digerire enzimaticamente quella organica.

Gli osteoblasti sono responsabili della produzione dei costituenti della matrice organica extracellulare, quali il collagene di tipo I e le proteine non collageniche.

Una volta che la matrice extracellulare viene secreta, va incontro a mineralizzazione: l'accumulo dei minerali è rapido, raggiungendo il 70% della densità in pochi giorni (mineralizzazione primaria). Tuttavia la deposizione di piccoli cristalli minerali continua lentamente per mesi (mineralizzazione secondaria).

Gli osteoblasti, richiamati nei siti di formazione ossea da citochine e fattori di crescita, dopo la secrezione della matrice rimangono inglobati in essa, prendendo il nome di osteociti. Il corpo degli osteociti rimane racchiuso in una nicchia

scavata nella sostanza intercellulare, la lacuna ossea, la cui forma ricalca quella della cellula, mentre i prolungamenti sono accolti all'interno di sottili canali scavati nel tessuto, chiamati canalicoli ossei.

Gli osteoblasti sono coinvolti anche nel processo di rimaneggiamento osseo; sono infatti in grado di innescare il riassorbimento della matrice ossea sia indirettamente, producendo attivatori degli osteoclasti, sia in modo diretto, secernendo enzimi proteolitici che ne scindono la componente organica (tra questi vi è la collagenasi, che agisce rimuovendo lo strato di tessuto osteoide non mineralizzato che riveste la superficie dell'osso, consentendo agli osteoclasti di aderire alla matrice minerale e dissolverla.)

L'azione litica degli osteoclasti si manifesta con la formazione della lacuna di Howship. Una volta formata la lacuna gli osteoclasti si staccano dalla matrice e, con moto ameboide, si spostano sulla porzione di osso adiacente a quella riassorbita, iniziando la formazione di una nuova lacuna. [2]

Il processo riparativo del tessuto osseo

Il processo riparativo endogeno, a carico dell'osso, è un evento fisiologico, in quanto il tessuto osseo è soggetto ad un continuo rimodellamento: l'osteogenesi consiste essenzialmente nella trasformazione di parti primitivamente costituite da tessuto connettivo (ossificazione connettivale o membranosa) o da tessuto cartilagineo (ossificazione condrale).

Nell'ossificazione membranosa si osserva, in corrispondenza del centro di ossificazione, un aumento della vascolarizzazione ed un accumulo di cellule

mesenchimali in prossimità dei capillari. Da esse originano gli osteoblasti che dopo aver secreto matrice, su cui depositano sali di calcio, rimangono imprigionati nella sostanza fondamentale, trasformandosi in osteociti.

Altre cellule mesenchimali evolvono in cellule del midollo osseo, che si differenziano durante la vita dell'individuo.

L'ossificazione pericondrale è molto simile a quella connettivale e spesso i due fenomeni si verificano contemporaneamente in un segmento osseo in formazione.

L'ossificazione endocondrale porta alla costruzione di tessuto osseo attorno a quello cartilagineo preesistente, come nei segmenti diafisari delle ossa lunghe.

La cartilagine attorno alla quale si forma il nuovo tessuto osseo viene poi progressivamente disgregata ad opera di cellule, dette condroclasti.

Gli spazi rimasti vuoti a seguito dell'erosione della cartilagine vengono successivamente occupati dalle cellule staminali che daranno origine al midollo osseo, dotato di attività ematopoietica.

In seguito a questi processi si forma tessuto osseo fibroso a fibre intrecciate (non lamellare). L'osso fibroso viene progressivamente sostituito con tessuto osseo secondario, ottenuto mediante l'erosione di quello primario e la deposizione di nuovo materiale, grazie all'azione erosiva congiunta di osteoclasti ed osteoblasti. Tale processo continua anche nell'individuo adulto dove il rimodellamento porta ad un perfezionamento strutturale del tessuto in base alle tensioni ed ai carichi cui è sottoposto.

Nei processi riparativi si ripete la sequenza di eventi tipici della normale istogenesi dell'osso.

Il processo di riparazione delle fratture è un modello guida utile per cercare di sviluppare una terapia razionale per la rigenerazione dell'osso.

La riparazione di una frattura avviene inizialmente con la formazione di un ematoma, conseguente al trauma e dovuto alla rottura dei vasi.

Successivamente si formano nuovi vasi a partire da quelli preesistenti (angiogenesi) e vengono reclutate cellule infiammatorie, fibroblasti e cellule staminali.

Le cellule infiammatorie rilasciano fattori di crescita e citochine, che svolgono un ruolo fondamentale nella riparazione.

Si formano così il tessuto di granulazione, che viene gradualmente rimpiazzato da fibrocartilagine, ed un callo esterno, mediante ossificazione intramembranosa; solo in seguito viene mineralizzato il callo interno.

Infine, come nel rimodellamento osseo fisiologico, il callo dovuto alla frattura viene rimpiazzato con osso secondario lamellare e il supporto vascolare ritorna normale.

Il ruolo dell'ematoma è fondamentale per la riparazione ossea poiché permette l'innescò della rigenerazione, dall'esterno dell'osso verso la zona midollare. [2, 5, 7]

Le gravi perdite di sostanza a carico del tessuto osseo: soluzioni offerte dall'ingegneria tissutale

In campo ortopedico, interventi di ricostruzione del tessuto osseo si rendono necessari in caso di ampie perdite di sostanza, conseguenti a gravi malformazioni congenite, eventi traumatici, ipoplasie, necrosi ischemiche, lesioni neoplastiche primarie (quali osteosarcomi e tumori ossei benigni) o secondarie (metastasi), poiché il perfetto equilibrio che porta alla riparazione del tessuto osseo, viene

inevitabilmente compromesso. [5]

I trattamenti chirurgici di uso corrente sono il trapianto di osso autologo o allogenico, oppure l'impianto protesico.

Un'alternativa a questi approcci tradizionali è rappresentata dall'ingegneria tissutale, che si avvale dell'uso di cellule viventi (e/o loro prodotti) e di **biomateriali** innovativi, per sviluppare sostituti tissutali in alternativa agli impianti artificiali.

I notevoli progressi compiuti negli ultimi anni in ambito biologico, con la scoperta delle potenzialità di utilizzo delle cellule staminali, ed in quello dell'ingegneria biomedica, con la realizzazione di materiali con caratteristiche sempre più simili ai tessuti biologici, hanno permesso lo sviluppo di tecnologie mirate al miglioramento della rigenerazione tissutale in vivo.

Un'alternativa promettente agli approcci tradizionali è costituita dall'**ingegneria tissutale**, le cui potenzialità hanno determinato un notevole impulso alla ricerca negli ultimi anni.

INGEGNERIA TISSUTALE E SCAFFOLD

Gli *scaffolds* per l'ingegneria tissutale dell'osso sono strutture altamente sofisticate, studiate per favorire l'attacco, l'adesione e la distensione cellulari, e in seguito la deposizione di nuovo tessuto osseo, che nel tempo possa colonizzare o rimpiazzare l'impianto artificiale.

Tali supporti possono esser rappresentati da membrane, reti o lamine, variando così nella forma e creando strutture ad elica, a cilindro o a bacchetta, a seconda del tipo di applicazione e del sito d'impianto. [8]

Sin dal principio, si è pensato di utilizzare materiali biologicamente inerti, per minimizzare la risposta immunitaria dell'organismo ospite nei confronti del supporto.

Solo negli ultimi anni l'interesse si è spostato sui *materiali bioattivi*, oltre che bioinerti.

Il materiale bioattivo ideale come sostituto osseo, oltre a possedere requisiti basilari, deve richiamare gli elementi osteogenici (osteoinduttività) e sostenere la rigenerazione del tessuto favorendo la differenziazione e la crescita delle cellule (osteoconduttività).

Ciò significa che nell'ambiente fisiologico la presenza dell'impianto e la sua degradazione devono indurre e mantenere condizioni che influenzino positivamente la sopravvivenza e la proliferazione cellulari, oltre alla deposizione della matrice extracellulare. [3]

Alle proprietà fondamentali di un biomateriale, quali biocompatibilità, biodegradabilità (se la sostituzione non è permanente) e processabilità (lavorazione e possibilità di sterilizzazione), devono essere affiancate precise caratteristiche chimiche (composizione) e fisiche (proprietà meccaniche, topografia di superficie, porosità).

Nella scelta del materiale e nel design della struttura dello *scaffold* deve essere valutata la natura del difetto scheletrico, che può interessare l'osso trabecolare o quello compatto.

Le diverse esigenze funzionali della porzione ossea da sostituire sono determinate dal tipo di forze meccaniche cui la stessa è sottoposta; infatti, le caratteristiche strutturali, quali elasticità e resistenza alla compressione, tipiche dell'osso compatto, influenzano notevolmente le risposte meccaniche, così come la capacità di sostenere e trasmettere forze di carico, proprie dell'osso spugnoso. [4]

Uno *scaffold* tridimensionale, per combinare efficaci proprietà fisiche nella micro- e nella macro-struttura, deve possedere un'elevata porosità interna.

La porosità e la struttura costituiscono parametri importanti nella valutazione di un supporto, in quanto da questi dipende la possibilità che il sostituto osseo neo-impiantato venga adeguatamente vascolarizzato ed eventualmente innervato.

Il grado di porosità varia in relazione all'applicazione di interesse: la dimensione dei pori ottimale per i tessuti duri si aggira intorno ai 100-400µm; è inoltre importante che la porosità del materiale sia elevata e uniformemente distribuita.

Tuttavia, è da considerare che la presenza di pori e interconnessioni incide significativamente sull'integrità meccanica della struttura.

Per questo è necessario un compromesso fra la porosità e la sua funzione biologica.[6, 8]

Nelle procedure di laboratorio, le cellule vengono seminate sullo *scaffold*, per poi esser trapiantate nel sito anatomico d'interesse; qui gli elementi cellulari cominciano a proliferare ed ad entrare nei pori interni del supporto.

Se la porosità e l'interconnessione tra i pori sono adeguate, le cellule riusciranno a crescere e colonizzare l'intero impianto, rilasciando la propria matrice cellulare.

Lo strato cellulare superficiale consuma una maggiore quantità di ossigeno e nutrienti, limitandone la disponibilità per le cellule intente a migrare verso l'interno dello *scaffold*; dunque, la massima profondità alla quale la sopravvivenza cellulare è garantita corrisponde alla profondità di penetrazione degli elementi cellulari.

Uno *scaffold* ideale dovrebbe possedere le seguenti caratteristiche:

- Biocompatibilità (bioinerzia) tale da non indurre risposte immunitarie avverse nei confronti dell'impianto o del tessuto ospite.
- Distribuzione e dimensione dei pori che garantiscano alle cellule uno spazio adeguato per la crescita e l'accesso a nutrienti e metaboliti.
- Superficie capace di fornire agli elementi cellulari una sufficiente area di adesione.
- Parametri strutturali idonei ai fini di regolazione della biosintesi cellulare.
- Osteoinduttività e osteoconduttività

MATERIALI PER SCAFFOLD

In passato, l'ingegneria tissutale ha cominciato ad interessarsi alla riparazione del tessuto osseo utilizzando una combinazione di cellule, fattori di crescita e biomateriali, al fine di riprodurre una varietà di tessuti connettivi (osseo, cartilagineo, legamentoso e tendineo) sia in vitro che in vivo.

Recentemente, la ricerca si è concentrata, oltre che sulla formazione ex-novo di un tessuto, sulle capacità funzionali dello stesso, cercando di impartire una funzionalità biomimetica agli innesti ortopedici e consentendo così il loro utilizzo nella pratica clinica.

Attualmente, l'attenzione è rivolta alla risoluzione dei problemi legati alla “biological fixation” ed all'integrazione funzionale tra il tessuto ospite e l'impianto. [9]

Gli *scaffolds* per tessuto osseo possono essere costituiti da materiali naturali, quali collagene, fibrina, acido ialuronico e membrane biologiche, che hanno una struttura simile a quella dei tessuti originali.

Nonostante questo, tali materiali risultano spesso di difficile preparazione e modellazione nei formati necessari, nonché possibili veicoli di malattie o infezioni; inoltre anche le proprietà meccaniche non riescono a soddisfare le aspettative.

Per sopperire a questi inconvenienti, le recenti ricerche, nel campo dell'ingegneria tissutale, hanno focalizzato la propria attenzione sull'utilizzo dei **biomateriali** nella fabbricazione dei supporti artificiali.

I materiali su cui si stanno concentrando i recenti studi e che vengono maggiormente utilizzati in ambito biomedico, sono rappresentati da:

- Ceramiche
- Polimeri sintetici
- Materiali compositi
- Metalli

Ceramiche

Elementi come il calcio e il fosfato, i componenti minerali fisiologici dell'osso, si ritrovano nelle ceramiche di origine naturale e non, reperibili in formulazioni e forme diverse.

Questi materiali sono strutturalmente molto simili all'osso e parzialmente modulabili nella porosità.

Possiamo riconoscere tre tipi principali di ceramiche, distinguibili in base alla risposta tissutale e al loro comportamento in vivo:

- Riassorbibili (Calcio-fosfati)
- Bioattivi (Idrossiapatite)
- Bioinerti (Alluminia, Zirconia)

Maggiormente utilizzata nell'ingegneria tissutale risulta essere l'**idrossiapatite (HA)**, in quanto componente inorganica primaria del tessuto osseo; essa è presente in diversi tessuti quali l'osso, la dentina e lo smalto dentale.

L'idrossiapatite ha dimostrato di essere un materiale intrinsecamente biocompatibile e osteoconduttivo: i fattori di crescita sono naturalmente attirati e

adsorbiti in vivo entro le cavità della struttura porosa, quindi questo materiale è in grado di condurre la formazione del tessuto osseo e di formare legami chimici con lo stesso, senza l'interposizione di uno strato fibroso.

Gli impianti sono fabbricati utilizzando l'idrossiapatite come matrice, modulando la porosità e la morfologia dei pori: la porosità è compresa tra i

100 e i 400 μm ; le strutture a macroporosità sono efficienti nel permettere ai nutrienti di raggiungere il tessuto attraverso l'impianto, così come le strutture a microporosità sono necessarie ai fini della capacità osteoinduttiva del materiale, poiché incrementano il processo di dissoluzione-precipitazione di calcio e fosforo a livello del materiale d'interfaccia.

Tuttavia l'idrossiapatite non si è dimostrata osteogenica; i tempi di degradazione sono lunghi e la scarsa resistenza meccanica al carico ed all'impatto rende le ceramiche relativamente "fragili", consentendone l'uso unicamente come riempimento, nel caso di difetti ossei, o per ricoprire impianti metallici al fine di migliorarne le proprietà superficiali dal punto di vista della compatibilità.

[10, 11, 12]

Polimeri Sintetici

I polimeri sono materiali organici che originano da polimerizzazioni controllate di singole molecole, dette monomeri.

Le reazioni di polimerizzazione possono essere di due tipi:

- Reazioni di condensazione, che ci permettono di ottenere i poliesteri

- Reazioni radicaliche di addizione, che ci permettono di ottenere polistirene o polietilene

I polimeri sintetici sono altamente modulabili nella forma e nella struttura chimica. La loro facile processabilità offre la possibilità di ottenere varie forme, alle quali coniugare biomolecole con diverse modalità.

La velocità di degradazione nel tempo è calcolabile matematicamente, ma durante tale processo vengono rilasciati monomeri acidi che possono ridurre il pH locale e, quindi, stimolare una risposta infiammatoria. [8]

I polimeri biomedicali, quando vengono a contatto con i fluidi biologici, in base al loro comportamento, possono essere classificati in biodegradabili e nonbiodegradabili.

Tra i **polimeri non degradabili** ricordiamo:

- Polietilene ad elevato peso molecolare, utilizzato in ortopedia
- Polimetilmetacrilato, polimerizzato in situ per i cementi ossei o utilizzato per lenti a contatto
- Polidimetilsilossano, usato per i tessuti molli e le lenti intraoculari

I **polimeri biodegradabili** sono materiali polimerici, generalmente poliesteri alifatici, che si degradano in ambiente fisiologico mediante l'idrolisi del legame estereo.

Le principali caratteristiche dei polimeri biorassorbibili sono rappresentate da:

- Proprietà meccaniche adeguate e garantite fino alla completa guarigione del tessuto circostante
- Facile processabilità

- Totale biodegradabilità
- Atossicità
- Resistenza
- Facile sterilizzazione

Tra i poliesteri, utilizzati come supporto artificiale, ricordiamo:

- Acido polilattico (PLA)
- Acido poliglicolico (PGA)
- Policaprolattone (PCL)
- Loro copolimeri

Sono largamente impiegati nell'ingegneria tissutale, specialmente per la rigenerazione guidata del tessuto-cartilagineo.

Tuttavia, la biodegradabilità di questi supporti, ne consente l'utilizzo solo per applicazioni a breve termine, per le quali è richiesta la presenza temporanea dell'impianto (materiali di sutura, membrane periodontali, sistemi a rilascio controllato di farmaci). [13]

Materiali Compositi

Una promettente alternativa è rappresentata dai materiali compositi: polimeri addizionati di particelle, fibre, tubi di ceramica e/o carbone anche con nanodimensioni ; il risultato è un ibrido con buone caratteristiche fisiche e meccaniche.

In effetti anche il tessuto osseo è un tessuto composito, costituito da una matrice polimerica (collagene) rinforzata con particelle di ceramica (idrossiapatite). Rappresentano una combinazione eterogenea di materiali diversi, al fine di ottenere specifiche proprietà fisiche, chimiche e meccaniche.

Il vantaggio offerto da tali materiali risiede nell'associazione delle migliori caratteristiche dei diversi costituenti. [14]

Metalli

I materiali metallici risultano particolarmente adatti alla costruzione di strutture capaci di sopportare carichi senza il rischio di grandi deformazioni elastiche; per questo motivo sono adatti alla sostituzione di tessuti duri come ossa e denti. La biocompatibilità del supporto è legata alla resistenza dello stesso nei confronti del potere corrosivo dei fluidi biologici; la corrosione può determinare il rilascio di ioni metallici in situ, nel tempo, il loro accumulo in altri distretti dell'organismo.

I metalli (e le leghe) maggiormente utilizzati come biomateriali, per la fabbricazione di protesi o mezzi di osteosintesi, sono:

- Titanio
- Ferro
- Cromo
- Cobalto
- Nichel

- Tantalio
- Molibdeno
- Tungsteno

Per le caratteristiche di **biocompatibilità**, **resistenza alla corrosione** e per le eccellenti **proprietà meccaniche** il *titanio* e le leghe di titanio rappresentano, da tempo, materiali d'elezione nella chirurgia ortopedica, orale e maxillo-facciale.
[11, 12]

SCAFFOLD IN TITANIO

Il *titanio* viene ormai riconosciuto quale migliore materiale metallico da utilizzare nella preparazione degli scaffolds, e questo grazie alle caratteristiche di cui è dotato, riassumibili in: **biocompatibilità**, notevole **resistenza alla corrosione**, **proprietà meccaniche** eccellenti ed elevata capacità di **osteointegrazione**.

Viene attualmente utilizzato soprattutto nella fabbricazione di impianti biomedici e dentali, ai fini della ricostruzione ossea, la quale offre interessanti opportunità nella chirurgia ortopedica, odontoiatrica e maxillo-facciale.

La **porosità** e l'**architettura dei pori** sono responsabili delle proprietà fisiche e meccaniche dello scaffold; diversi studi hanno dimostrato che, controllando le stesse, è possibile ottenere elasticità e forza simili a quelle della corticale ossea.

La fisica, l'ingegneria e lo studio degli organismi viventi hanno altresì dimostrato che l'ingombro non rappresenta necessariamente un prerequisito per la resistenza e la robustezza di un materiale, motivo per cui, anche una struttura porosa è in grado di garantire tali proprietà, cui si associano quelle che hanno reso indispensabile l'utilizzo di supporti ad elevata porosità, essendo quest'ultima la sola capace di assicurare la crescita e il nutrimento degli elementi cellulari, così come la vascolarizzazione e l'innervazione del tessuto.

Tuttavia, l'elevata porosità lede inevitabilmente l'integrità strutturale dell'impianto, e questo ci porta a stabilire dei limiti relativi alla stessa, oltre che alla dimensione dei pori (100-400 μm). [1, 12, 14]

Gli scaffolds in titanio non possiedono la capacità di biodegradazione; questo può essere considerato un vantaggio, in quanto la persistenza del supporto, se associata

a proprietà quali bioinerzia e resistenza alla corrosione, è in grado di conferire una maggiore stabilità meccanica a livello della sede d'impianto. [12]

Diversi studi sono stati condotti relativamente alla **bioattività superficiale** degli scaffolds in titanio; molte tecniche sono state sviluppate per migliorare la bioattività di superficie, al fine di aumentare la velocità di guarigione e di prolungare la vita dell'impianto, favorendo la formazione di un legame diretto, tra l'osso e il supporto, avente una forza pari o superiore a quella del tessuto ospite. Inoltre, rivestendo la superficie dello scaffold con altri materiali, come l'**idrossiapatite (HA)**, è stato evidenziato un miglioramento nella formazione ossea, da cui deriva una fissazione più rapida e permanente dell'impianto al tessuto circostante.

Bisogna aggiungere che la corretta rugosità della superficie implantare migliora l'adesione degli osteoblasti e, di conseguenza, l'attività di sintesi in vitro e il processo di osteointegrazione in vivo; ottimizzando la chimica, la geometria della superficie e la topografia di un impianto osseo saremo in grado di aumentare notevolmente le possibilità di un esito clinico positivo. [14]

In generale, i materiali metallici hanno tenacità e rigidità superiori rispetto all'osso, ciò impedisce che le sollecitazioni necessarie e fisiologiche vengano trasferite al tessuto osseo adiacente l'impianto, con conseguenti riassorbimento dell'osso che circonda il supporto e allentamento dello scaffold stesso.

Questa incompatibilità biomeccanica, che porta alla morte dell'osso, è definita "**stress shielding effect**".

Molti dei recenti studi nel campo dell'ingegneria tissutale sono rivolti alla risoluzione di questo problema: è stato evidenziato che con le *leghe a base*

tititanio è possibile combinare l'elevata resistenza del materiale ad una elasticità simile a quella del tessuto ospite. [11]

Esistono diversi metodi di fabbricazione degli scaffolds in titanio, il cui obiettivo è quello di eliminare gli inconvenienti legati all'ossidazione del metallo e alla presenza di impurità, che potrebbero presentarsi durante il processo di preparazione.

Tra i metodi oggetto di ricerca e potenzialmente applicabili su scala industriale, ricordiamo:

- *Rapidprototyping (RP) technique*, che viene considerata una tecnica estremamente potente capace di controllare la struttura dei pori e l'architettura del supporto mediante sistemi computerizzati, combinando il computer-aided design (CAD) e il computer-aided manufacturing (CAM). [15]
- *Freeze casting (FC) method*, che sfrutta la modulazione di diversi parametri (temperatura di congelamento, tempo di congelamento, direzione di congelamento, mezzo di congelamento, etc.) per fabbricare impianti in vari tipi di materiale poroso, offrendo la possibilità di produrre scaffolds su scala industriale. [16]
- *Tecniche di fabbricazione per metalli porosi a celle aperte o a celle chiuse*

Una classificazione importante dei metalli porosi, o schiume metalliche, è quella tra “celle aperte” e “celle chiuse”. Nei metalli a celle chiuse ogni cella è completamente racchiusa da una parete sottile o membrana di metallo, mentre nei metalli a celle aperte le singole celle sono interconnesse, permettendo al tessuto di infiltrarsi nella schiuma e fissarsi al supporto.

I metalli porosi a celle chiuse sono solitamente il risultato di un processo casuale, in cui la dimensione, la forma e la posizione dei pori all'interno della matrice variano a seconda dei parametri di fabbricazione del processo. Il risultato è generalmente rappresentato da un materiale a limitata porosità e significative variazioni a carico di dimensione e forma dei pori, anche se un'attenta selezione dei parametri di schiumatura potrebbe migliorare l'omogeneità.

Esistono tre tipi distinti di impianti porosi:

- (1) substrati a parziale o completo rivestimento solido poroso
- (2) materiali completamente porosi
- (3) segmenti di metalli porosi uniti a parti metalliche solide

Ci sono diversi campi d'applicazione nei quali è potenzialmente possibile utilizzare sia materiali a rivestimento poroso che impianti completamente porosi.

I processi di fabbricazione variano in base alla complessità di preparazione e al tipo di materiale poroso che si intende produrre; alcuni processi, come la fusione o la deposizione di vapore, tendono a consentire un maggiore controllo su dimensione, distribuzione e interconnettività dei pori.

Altri processi, che coinvolgono la decomposizione di agenti espandenti in una matrice di metallo fuso o in polvere, portano alla formazione di materiali a porosità inferiore, scarsa interconnettività e imprevedibile distribuzione dei pori.

[17]

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della tesi è stato quello di valutare, mediante indagini radiografiche e tomografiche, e successivamente attraverso scansioni microradiografiche e studi istologici, l'evoluzione dei processi riparativi a carico del tessuto osseo, in seguito all'impianto di un nuovo *scaffold in titanio*, in un modello sperimentale ovino.

Il maggiore difetto degli *scaffolds* in ceramica o polimeri sintetici è la ridotta resistenza al carico; pur essendo dotati di un'elevata capacità osteointegrativa, si presentano rispettivamente fragili e biodegradabili, caratteristiche che non consentono loro di resistere alle sollecitazioni meccaniche fisiologiche tipiche di determinate porzioni dell'apparato scheletrico, sia nelle fasi precoci dell'impianto che negli stadi successivi, quando la loro integrazione e/o sostituzione non è ancora completa o quando dipende da device di sostegno.

Il nostro è uno studio preliminare volto a dimostrare la maggiore efficacia degli impianti in titanio rispetto ai supporti costituiti da altri materiali, nella risoluzione dei difetti caratterizzati da gravi perdite di sostanza ossea. Questi *scaffolds* infatti potrebbero essere in grado di sostenere il carico e le forze meccaniche che gravano sulla zona anatomica d'interesse sia nella fase iniziale che nelle fasi successive di neodeposizione ossea.

MATERIALI E METODI

Scaffolds in titanio per lo studio: fabbricazione e proprietà

Nel nostro studio sono stati utilizzati due tipi di *scaffolds* in titanio, dotati di finiture superficiali diverse e di un differente grado di macroporosità, al fine di valutare l'influenza di tali fattori sui processi di rigenerazione e riparazione ossea.

Gli impianti presentavano **macropori** capaci di garantire la vascolarizzazione, l'innervazione ed il nutrimento del tessuto osseo neoformato, consentendone una crescita omogenea e diffusa all'interno del supporto.

Per valutare la "porosità ideale" sono stati impiegati due *scaffolds* differenti:

- ***Tipo A: Scaffolds a Struttura cilindrica perforata con doppia camera (figura 1, figura 2)***

Si tratta di un cilindro con due camere vuote all'interno, la cui superficie esterna si presenta perforata al 40% (40% vuoto e 60% pieno). Ad ogni camera corrisponde una diversa dimensione dei pori. I più grandi misurano 2,1 mm di diametro, mentre i più piccoli misurano 1.4 mm di diametro. Con questo modello si vuole evidenziare il comportamento dei due diversi tipi di fori rispetto alla crescita d'osso, nella parte interna vuota del supporto.

- ***Tipo B: Scaffolds a Struttura porosa tridimensionale di tipo giroide (figura 2)***

La struttura porosa tridimensionale è costituita da una struttura cilindrica con celle regolari 3D del tipo giroide. La porosità è stata calcolata come volume totale del cilindro / volume totale di metallo utilizzato, e risulta essere una struttura porosa al 90% (sul volume totale del cilindro il 90% dello spazio è rappresentato da aria, il restante 10% è rappresentato da metallo).



Figura 1

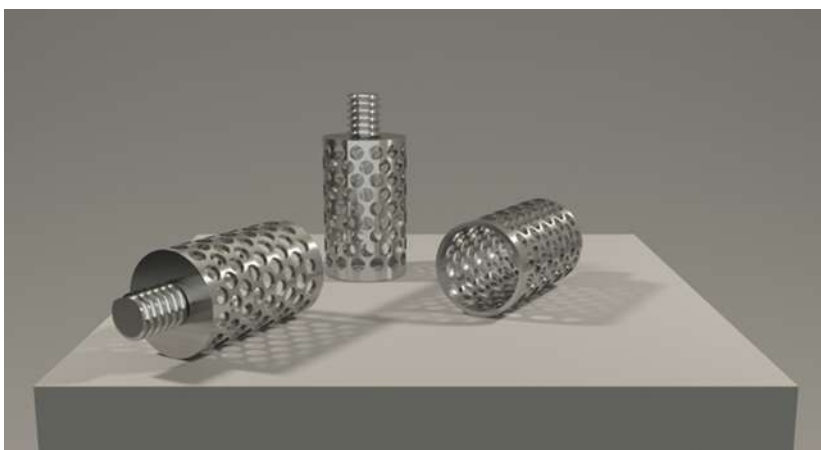


Figura 2

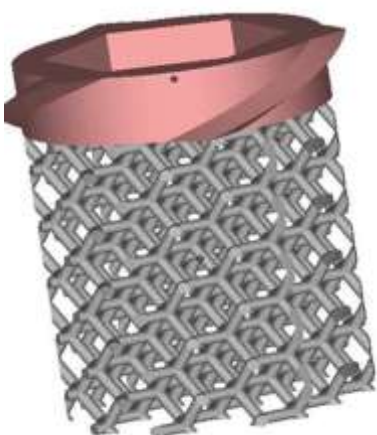


Figura 3

Come riportato in letteratura, le caratteristiche di superficie dei materiali influenzano l'adesione degli osteoblasti sul biomateriale; pertanto, la porosità e la dimensione dei pori del supporto svolgono un ruolo critico nella formazione dell'osso in vitro ed in vivo, in quanto è loro compito stimolare l'adesione, la proliferazione ed il differenziamento cellulari. [2]

La dimensione minima dei pori, necessaria per il miglioramento dell'osteointegrazione, è di 300 μm ; un limite superiore di porosità e dimensione dei pori deve essere definito in base alle proprietà meccaniche ed alle dimensioni anatomiche del tessuto interessato. [7]

La tecnologia scelta per la produzione dei nostri impianti è stata la *Fusione a fascio di elettroni (EBM)*, basata sulla dissociazione elettrone-indotta di un precursore molecolare precedentemente adsorbito sulla superficie del substrato e costantemente alimentato. [9]

Al giorno d'oggi, le tecniche di EBM possono essere utilizzate con successo in una vasta gamma di applicazioni industriali, che comprendono la preparazione dei materiali porosi a partire dalle polveri di metallo.

L'EBM, che è stata sviluppata di recente dall'azienda svedese *Arcam*, si è dimostrata esternamente versatile se applicata al campo dell'ingegneria biomedica e tissutale: recenti studi hanno dimostrato i vantaggi legati all'utilizzo di questa tecnica per la fabbricazione di impianti destinati alla chirurgia ortopedica.

L'ARCAM S12 è un processo rapido in cui un fascio di elettroni edifica la struttura desiderata a partire dalla polvere di metallo, strato dopo strato.

Il metallo utilizzato per produrre gli impianti è rappresentato dalla **lega di titanio Ti6Al4V-ELI**, ampiamente utilizzata nelle applicazioni mediche, grazie alle sue proprietà meccaniche, di biocompatibilità e di resistenza alla corrosione.

Eventuali forme e geometrie, anche molto complesse, sono facilmente realizzabili poiché il comportamento meccanico del prodotto può essere regolato e controllato.

Secondo i risultati sperimentali riportati in letteratura e riguardanti il miglioramento della vascolarizzazione e dell'ossigenazione dei tessuti, oltre che la capacità di osteointegrazione dei materiali impiantabili, l'EBM consente di ottenere protesi innovative utilizzando una microstruttura definita "*TrabecularTitanium*"; le strutture porose in titanio sono quelle maggiormente capaci di imitare la morfologia dell'osso trabecolare. [13]

Le proprietà dei supporti ottenuti mediante EBM risultano superiori rispetto a quelle degli impianti fabbricati mediante differenti processi di produzione, essendo l'EBM un processo di fusione, non di sinterizzazione. [17, 9]

Preparazione degli scaffolds da impiantare

Per il nostro studio sono stati utilizzati 6 scaffolds:

- 3 scaffolds di *Tipo A* (a struttura cilindrica perforata con doppia camera)
- 3 scaffolds di *Tipo B* (a struttura porosa tridimensionale di tipo giroide)

Ogni scaffold è stato impiantato in un soggetto diverso (per un totale di 6 ovini):

- Nel **Soggetto n. 1** è stato impiantato uno scaffold di *Tipo A*
- Nel **Soggetto n. 2** è stato impiantato uno scaffold di *Tipo A*, tra le cui maglie sono stati inseriti:
 - 200 mg di TSP (Fosfato Tricalcico Siliconato) MilleniumBiologix Canada
 - 2 ml di Colla di fibrina BexterTissucal
- Nel **Soggetto n. 3** è stato impiantato uno scaffold di *Tipo A*, tra le cui maglie sono stati inseriti:
 - 200 mg di TSP
 - 2 ml di Colla di fibrina
 - $1,4 \times 10^7$ MSC (MesenchymalStemCells) prelevate dal midollo, al terzo passaggio in espansione
- Nel **Soggetto n. 4** è stato impiantato uno scaffold di *Tipo B*
- Nel **Soggetto n. 5** è stato impiantato uno scaffold di *Tipo B*, tra le cui maglie sono stati inseriti:
 - 200 mg di TSP

-2 ml di Colla di fibrina

- Nel **Soggetto n. 6** è stato impiantato uno scaffold di *Tipo B*, tra le cui maglie sono stati inseriti:

-200 mg di TSP

-2 ml di Colla di fibrina

- $1,4 \times 10^7$ MSC

La *Colla di fibrina* è un “adesivo tissutale” costituito da due componenti, fibrinogeno e trombina, oltre a fattori della coagulazione (come fattore XIII), e agisce iniettando in successione i due componenti in presenza di ioni calcio contenuti nella soluzione per ricostituire la trombina. Quest’ultima converte il fibrinogeno in fibrina in un arco di tempo ristretto.

La colla di fibrina viene utilizzata principalmente con i seguenti obiettivi: facilitare l’adesione tissutale, coadiuvare le suture chirurgiche e favorire l’emostasi.

Il *Fosfato Tricalcico Siliconato (TSP)* viene utilizzato per la sua capacità osteoinduttiva, al fine di stimolare la proliferazione e l’adesione degli elementi cellulari.

Le moderne strategie di ingegneria tissutale combinano le *cellule viventi* ed i biomateriali per sviluppare sostituti biologici che siano in grado di ripristinare le funzioni del tessuto ospite. Gli scaffolds cercano di mimare l’ambiente tridimensionale della matrice extracellulare (ECM), di fornire in poco tempo stabilità meccanica al trapianto e di fornire una superficie maggiore per la

migrazione, l'adesione e la differenziazione delle cellule, in modo da poter sostenere la crescita del nuovo tessuto. Le cellule si sono dimostrate molto importanti nella costruzione dei nuovi tessuti attraverso la sintesi della matrice extracellulare; mentre proliferano, colonizzano il supporto e determinano la formazione del nuovo tessuto all'interno dell'impianto.

Le *cellule staminali adulte*, come le *cellule staminali mesenchimali (MSC)*, sono considerate più promettenti, poiché hanno un alto potenziale di differenziazione e raramente inducono la formazione di neoplasie.

Le cellule in vivo sono a contatto con le altre cellule, l'ECM o i fluidi, è quindi fondamentale fornire alle stesse un microambiente specifico ed un "ponteggio" in grado di supportare la colonizzazione, la migrazione, la crescita e la differenziazione cellulari. [26]

Qualunque sia il materiale di base, il sostituto osseo deve interagire con l'ambiente e con le cellule, sia in vitro che in vivo. Lo scaffold migliore è quello capace di stimolare l'adesione, la proliferazione ed il differenziamento cellulari, favorendo così la rigenerazione e l'integrazione nel tessuto osseo preesistente.

Gli interventi riparativi mediante *tissueengineerings*si avvalgono dell'uso di *cellule*, precedentemente isolate, che vengono seminate sullo scaffold prima del suo impianto nel paziente (sistemi cellulari).

Le cellule candidate a questo impiego sono cellule mature o *cellule staminali* embrionali (ES), germinali (EG), e adulte (come le BMSC). Le staminali sono cellule indifferenziate capaci di rigenerarsi per tempi prolungati. Quelle embrionali teoricamente possiedono un illimitato potere proliferativo in coltura ma sollevano problematiche di natura etica. Le cellule staminali adulte hanno mostrato una sorprendente versatilità ed un discreto potenziale proliferativo; per questo sono adatte alla rigenerazione tissutale, anche se la “spinta” replicativa decresce quando sono mantenute in coltura in vitro (25-40 passaggi).

Le cellule staminali adulte del compartimento osseo sono chiamate osteoprogenitori, cioè i precursori delle cellule mature, che ancora sono presenti nei tessuti midollari. Il midollo osseo adulto contiene, oltre a staminali emopoietiche, cellule staminali non-emopoietiche di tipo mesenchimale (Bone marrowstromalcells o BMSC).

Le staminali mesenchimali (MSC) sono dotate di capacità di automantenimento e di multipotenzialità, cioè capacità di differenziarsi in osteoblasti, condrociti, adipociti, miociti e fibroblasti. [24]

Questa potenzialità giustifica il ruolo critico svolto da questa popolazione cellulare nell’organogenesi, nel rimodellamento e riparazione dei tessuti.

Questa popolazione di precursori mesenchimali è considerata una promettente fonte di cellule per applicazioni in ingegneria tissutale, grazie alla caratteristica

pluripotenza, cioè la proprietà di differenziare in cellule dei tessuti sopra citati, sotto un opportuno stimolo.

Procedura sperimentale

Previa autorizzazione ministeriale (D.LV.116/92), lo studio è stato condotto presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Bari Aldo Moro.

Nello studio sono stati compresi 6 ovini di Razza Bergamasca, di sesso femminile e peso corporeo compreso fra 35 e 45 kg.

Tutti gli ovini sono stati sottoposti ad indagini cliniche, al fine di accertarne lo stato di salute, ad esame radiografico e tomografico, per verificare la completa assenza di patologie a carico del compartimento anatomico d'interesse (i condili tibiali dell'arto destro) ed ad esame ecografico atto ad escludere eventuali stati di gravidanza.

Gli animali sono risultati idonei alla sperimentazione, quindi un mese prima dello studio sono stati ambientati in un box con libero accesso all'acqua ed alimentati con foraggio misto e concentrato.

I soggetti sono stati tenuti a digiuno per 36-48 ore prima dell'inizio dell'anestesia e sono stati sottoposti a terapia antibiotica con Ampicillina (20 mg/Kg) e

antinfiammatoria-analgeseica con Ketoprofene (1 mg/Kg) un'ora prima dell'inizio della chirurgia.

In seguito al posizionamento di un catetere endovenoso (21 G) nella vena auricolare, è stato iniettato DiazepamHCl (0,4 mg/Kg) per indurre la sedazione del soggetto. Per la fluidoterapia è stato utilizzato Ringer Lattato (10 mg/Kg/h).

Dopo la preparazione asettica, è stata realizzata un'anestesia subaracnoidea a livello dello spazio intervertebrale L7/S1, in modo da ottenere un'analgeseia degli arti posteriori mediante un'associazione tra Bupivacaina 0,5% (1 ml/10 Kg) e Buprenorfina (10 µg/Kg).

Per quanto riguarda la procedura chirurgica, ciascun soggetto è stato posizionato sul tavolo operatorio in decubito laterale; la porzione anatomica comprendente e circostante l'articolazione femoro-tibio-rotulea dell'arto posteriore destro è stata preparata asetticamente per la chirurgia.

Tramite accesso mediale, è stata eseguita un'incisione cutanea di 2 cm distalmente all'articolazione del ginocchio, partendo in corrispondenza della cresta tibiale e procedendo in senso dorso-ventrale, fino all'altezza del condilo mediale.

Successivamente si è passati all'incisione del tessuto sottocutaneo lungo la stessa linea; in seguito allo spostamento del muscolo tibiale mediante un divaricatore autostatico, è stato possibile procedere allo scollamento del periostio della porzione di tibia interessata. È poi stata creata una lesione a livello della spongiosa dell'area intercondiloidea anteriore tibiale: è stato effettuato un foro

(diametro di 6 mm, profondità di 8 mm) mediante l'impiego di un trapano a basso numero di giri, provvisto di punta da 6 mm inserita in una guida di 7 mm.

Quindi lo scaffold è stato inserito nel difetto creato a livello del tessuto osseo intercondiloideo della tibia. **(foto 1)**



Foto 1.

Infine il tessuto sottocutaneo e la cute sono stati suturati rispettivamente con Polyglactyn 910 e Nylon.

Nell'immediato postoperatorio sono stati eseguiti esami radiografici nelle proiezioni ortogonali antero-posteriore e medio-laterale, mediante l'utilizzo di un'apparecchiatura digitale indiretta, ed esami tomografici, al fine di valutare il danno osseo ed il corretto inserimento dell'impianto.

L'esame tomografico è stato eseguito con l'animale in sedazione profonda, posto in decubito dorsale e con l'arto posteriore esteso caudalmente, mediante scansione di 1 mm con avanzamento di 1 mm.

La medesima procedura è stata eseguita nei 6 ovini oggetto della sperimentazione. Gli animali sono stati sottoposti a terapia antibiotica ed analgesica postoperatoria.

Nelle 24 ore successive all'intervento chirurgico ogni paziente è stato posto in isolamento nel proprio box, ove è rimasto a digiuno per le 6 ore postoperatorie ed è stato sottoposto a terapia antinfiammatoria-analgesica, mediante Ketoprofene (1 mg/Kg), e antibiotica, mediante Ampicillina (250 mg/Kg).

Trascorse 24-48 ore postoperatorie, il soggetto tenuto in isolamento è stato reintrodotta nel gruppo.

La durata della sperimentazione è stata di 12 mesi. Durante tale fase sono stati condotti periodicamente esami clinici, esami radiografici ed esami di tomografia assiale computerizzata.

Le **indagini cliniche** sono state condotte tramite esame ortopedico del soggetto in stazione quadrupedale ed al passo, al fine di valutare l'assenza di zoppie e di reazioni algiche; inoltre è stata valutata l'assenza, nel sito chirurgico, di eventuali infezioni o reazioni cutanee secondarie all'intervento.

Sono stati condotti **esami radiografici** sia nel pre-operatorio che nel post-operatorio e successivamente ad intervalli di tempo regolari durante i 12 mesi.

Nel post-operatorio è stato valutato il corretto posizionamento del biomateriale.

Negli esami periodici sono stati valutati: la presenza di reazioni ossee nei confronti del biomateriale, la formazione di osteofiti, la presenza di reazioni da corpo estraneo radiograficamente rilevabili, le infezioni, etc.

Per quanto riguarda le **indagini tomografiche** è stata valutata, in primo luogo, l'interferenza tra il biomateriale in titanio e la scansione CT medesima, per escludere eventuali artefatti. È inoltre stato possibile misurare la densità dell'osso neoformato e la densità dell'osso circostante.

Tutti i soggetti al termine della sperimentazione sono stati sottoposti ad eutanasia, previa narcosi con Tiopentale sodico, tramite iniezione di Embutramide + Mebenzonio ioduro + Tetracaina (Tanax®) alla dose di 3 ml/10 kg ev.

Successivamente sono state espantate le diafisi tibiali di tutti i soggetti, compresi gli impianti.

I segmenti ossei espantati sono stati fissati in formaldeide al 4% in tampone fosfato 0.1 M, ad un pH 7.2. Dopo il lavaggio in tampone fosfato (PBS), sono stati rimossi i tessuti molli circostanti.

Sono state ottenute successivamente sezioni trasversali seriali sia dalla regione dell'impianto che dalla corrispondente regione diafisaria della tibia non operata.

Sono state poi effettuate sezioni alternative per gli studi di microradiografia ed istologia.

Per l'analisi quantitativa microradiografica, le diafisi della tibia sono state tagliate 1 cm sopra e sotto l'impianto, fissati in formalina, disidratati ed inclusi in

metilmetacrilato. Le sezioni trasversali (100-200 μm di spessore) sono state ottenute utilizzando un microtomo dotato di una lama rotante diamantata (Leica, Wetzlar, Germania). Le immagini sono state preparate utilizzando un generatore di raggi X XRG 3000 (Ital strutture, Riva del Garda, Italia), impostato a 12 KV e 20 mA per 15 min., ed una pellicola Kodak[®] ad alta definizione (Rochester, NY). Le pellicole sviluppate con Kodak[®] D-19 sono state fissate, lavate ed osservate utilizzando microscopio Axiophot Zeiss[®] (Zeiss, Jena, Germania).

Le immagini microradiografiche sono state poi fotografate al microscopio ottico (Eclipse E400[®], Nikon, Tokyo, Japan), dotato di fotocamera digitale Nikon[®] (2.5 X ingrandimento).

Per lo studio istologico, i campioni sono stati decalcificati in EDTA al 10% in tampone cacodilato 0.1 M (pH 7,0), fissati successivamente per 4 h in formaldeide, ed inclusi in paraffina. Le sezioni ottenute spesse 4 μm sono state colorate con ematossilina-eosina, colorazione di Von Kossa e blu di toluidina.

RISULTATI

Le indagini cliniche sono state basate sulla valutazione ortopedica del soggetto. L'esame obiettivo generale non ha messo in evidenza, nel periodo post-operatorio, ipertensione o modificazioni dei distretti e degli apparati imputabili a reazioni avverse nei confronti del biomateriale; i punti di sutura sono stati rimossi dieci giorni dopo l'intervento.

L'esame obiettivo particolare della regione sottoposta all'intervento chirurgico, in stazione, non ha evidenziato modificazioni morfologiche.

Al passo, solo uno degli animali presentava zoppia e lieve disturbo funzionale.

Le prove funzionali a carico delle articolazioni interessate non hanno messo in evidenza, in nessun caso, reazioni algiche; non è stata osservata la presenza di infezioni durante tutto il periodo di osservazione.

L'obiettivo dell'**esame radiografico** è stato quello di evidenziare la neoformazione di tessuto osseo attorno ed all'interno dello scaffold.

Con le **indagini tomografiche** è stato possibile comparare la densità ossea iniziale, ossia dopo l'impianto (t_0), con la densità ossea rilevata dopo 9 mesi (t_1) dall'intervento, al fine di valutare la capacità *osteoaduttiva* e *osteoaduttiva* dei diversi tipi di scaffolds utilizzati. (**tabella 1**)

	T0	T1
Soggetto N.ro 1	584	397
Soggetto N.ro 2	316,5	54
Soggetto N.ro 3	-323,5	196
Soggetto N.ro 4	529	626
Soggetto N.ro 5	583	773
Soggetto N.ro 6	1019	546

Tabella 1. Media dei valori, espressi in HU (Unità di Hounsfield), rilevato nei 6 soggetti nell'immediato post-operatorio (T0) e dopo 9 mesi (T1).

Le immagini relative allamicroradiografia ed all'istologia, ottenute in seguito all'eutanasia dei soggetti ed al successivo espianto dei segmenti ossei, hanno consentito di valutare la capacità di biocompatibilità edosteointegrazione dell'impianto nei confronti del tessuto osseo circostante, in relazione o meno alla presenza del fostato tricalcico siliconato e delle cellule mesenchimali staminali.

I soggetti sono stati sottoposti a molteplici **visite di controllo** nell'arco dei 12 mesi successivi all'impianto: solo uno degli animali presentava zoppia al passo e lieve disturbo funzionale; tutti gli altri soggetti poggiavano e caricavano l'arto posteriore destro in modo corretto, non presentavano alcuna zoppia ed il movimento durante la deambulazione si dimostrava normale; alle prove ortopediche gli animali non manifestavano alcuna reazione algica e non si apprezzavano rumori articolari nelle prove passive di flessione ed estensione, così come in quelle di iperflessione ed iperestensione.

Soggetto N.ro 1

Alla *valutazione radiografica* nelle proiezioni ortogonali, eseguita nell'immediato postoperatorio (**figura 4**), è stato possibile evidenziare un buon posizionamento dello scaffold a livello della metafisi prossimale della tibia.

A 9 mesi dall'impianto (**figura 5**) è stato possibile osservare un'ottima integrazione dello scaffold all'interno del tessuto osseo, in assenza di segni litici peri-materiale, di anomale reazioni periostali e di manifestazioni a carattere infiammatorio a carico del tessuto ospite.



Figura 4



Figura 5

L'*esame tomografico* ha evidenziato artefatti dovuti al Titanio impiegato per la fabbricazione dello scaffold, sia nell'immediato post-operatorio (**figura 6**) che a 9 mesi dall'impianto.

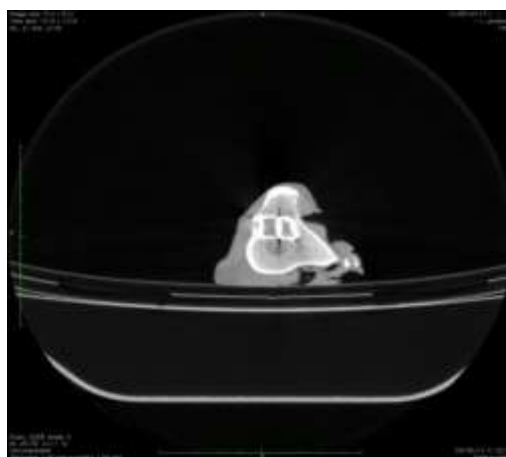


Figura 6

L'immagine istologica (figura 7), ottenuta con colorazione di Van Kossa, mostra l'interfaccia osso-metallo, in assenza di lesioni osteofitiche o osteolitiche.

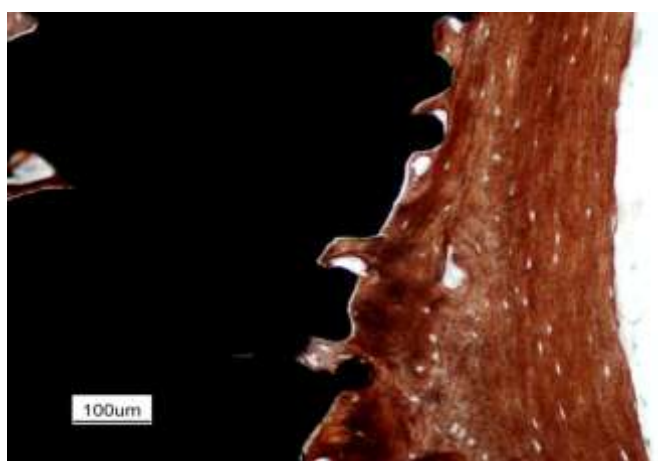


Figura 7

La scansione microradiografica trasversale mostra che, dopo 12 mesi dall'intervento chirurgico, la forma dell'impianto è ancora riconoscibile e che l'osso neoformato si deposita principalmente sulle sue superfici esterne; è possibile, inoltre, rilevare la perfetta integrazione dello scaffold con l'osso trabecolare circostante (figura 8).

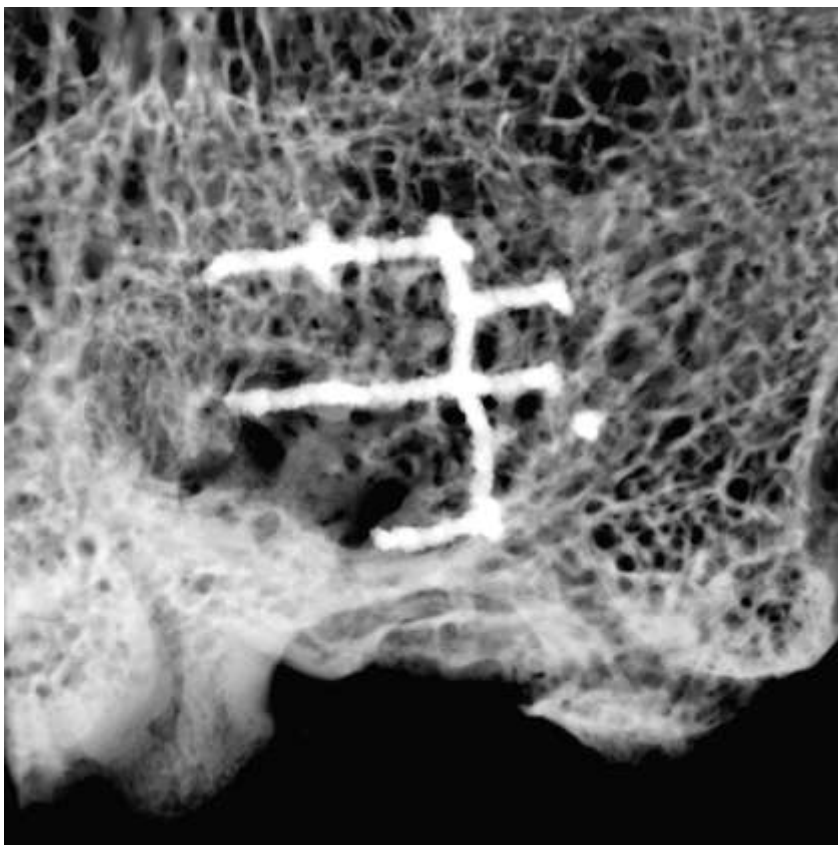


Figura 8

Soggetto N.ro 2

Alla *valutazione radiografica* nelle proiezioni ortogonali, eseguita nell'immediato post-operatorio (**figura 9**), è stato possibile evidenziare un buon posizionamento dello scaffold a livello della metafisi prossimale della tibia.

A 9 mesi dall'impianto (**figura 10**) è stato possibile osservare un'ottima integrazione dello scaffold all'interno del tessuto osseo, in assenza di segni litici peri-materiale, di anomale reazioni periostali e di manifestazioni a carattere infiammatorio a carico del tessuto ospite.



Figura 9



Figura 10

L'*esame tomografico* ha evidenziato artefatti dovuti al Titanio impiegato per la fabbricazione dello scaffold, sia nell'immediato post-operatorio (**figura 11**) che a 9 mesi dall'impianto.

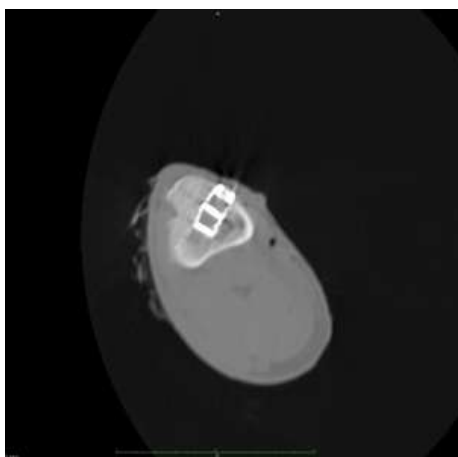


Figura 11

L'immagine istologica (figura 12), ottenuta con colorazione di Van Kossa, mostra l'interfaccia osso-metallo, in assenza di lesioni osteofitiche o osteolitiche.

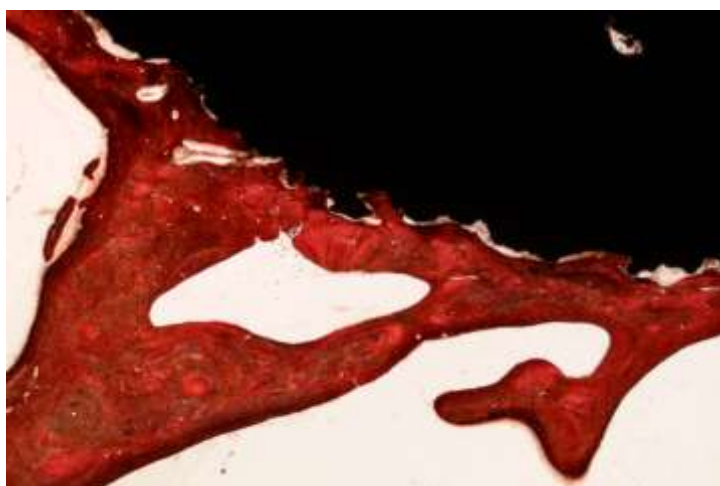


Figura 12

Soggetto N.ro 3

Alla *valutazione radiografica* nelle proiezioni ortogonali, eseguita nell'immediato post-operatorio (**figura 13**), è stato possibile evidenziare un buon posizionamento dello scaffold a livello della metafisi prossimale della tibia.

A 9 mesi dall'impianto (**figura 14**) è stato possibile osservare un'ottima integrazione dello scaffold all'interno del tessuto osseo, in assenza di segni litici peri-materiale, di anomale reazioni periostali e di manifestazioni a carattere infiammatorio a carico del tessuto ospite.



Figura 13



Figura 14

L'*esame tomografico* ha evidenziato artefatti dovuti al Titanio impiegato per la fabbricazione dello scaffold, sia nell'immediato post-operatorio (**figura 15**) che a 9 mesi dall'impianto.

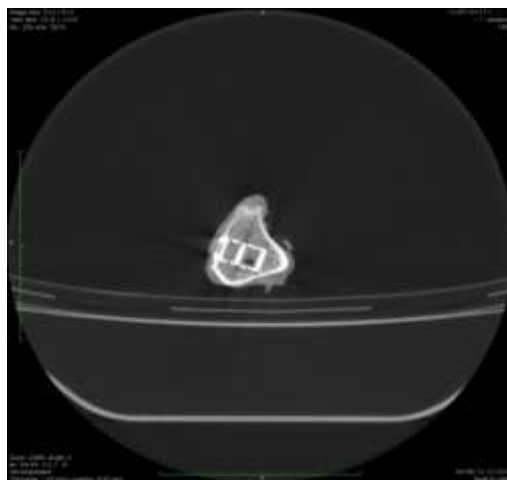


Figura 15

L'immagine istologica (figura 16), ottenuta con colorazione di Van Kossa, mostra l'interfaccia osso-metallo, in assenza di lesioni osteofitiche o osteolitiche.

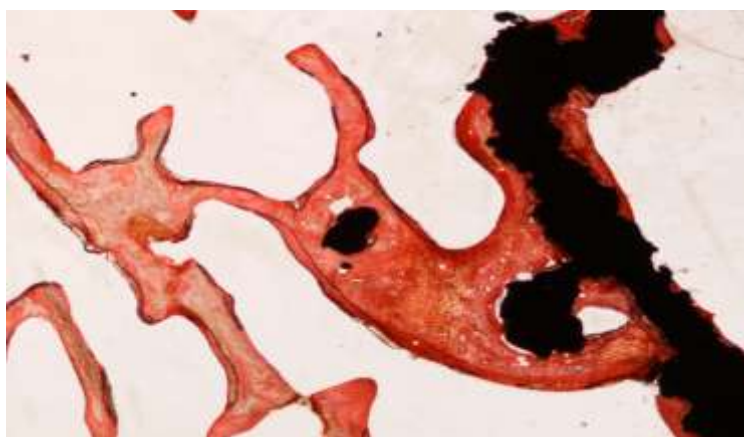


Figura 16

Soggetto N.ro 4

Alla *valutazione radiografica* nelle proiezioni ortogonali, eseguita nell'immediato post-operatorio (**figura 17**), è stato possibile evidenziare un buon posizionamento dello scaffold a livello della metafisi prossimale della tibia.

A 9 mesi dall'impianto (**figura 18**) è stato possibile osservare un'ottima integrazione dello scaffold all'interno del tessuto osseo, in assenza di segni litici peri-materiale, di anomale reazioni periostali e di manifestazioni a carattere infiammatorio a carico del tessuto ospite.



Figura 17



Figura 18

L'*esame Tomografico* ha evidenziato artefatti dovuti al Titanio impiegato per la fabbricazione dello scaffold, sia nell'immediato post-operatorio (**figura 19**) che a 9 mesi dall'impianto.

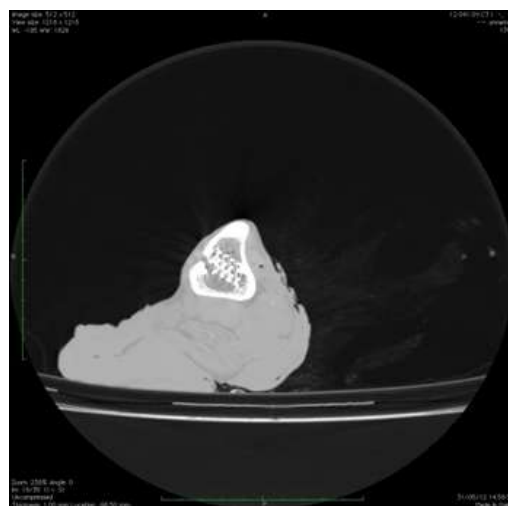


Figura 19

L'immagine istologica (figura 20), ottenuta con colorazione di Van Kossa, mostra l'interfaccia osso-metallo, in assenza di lesioni osteofitiche o osteolitiche.

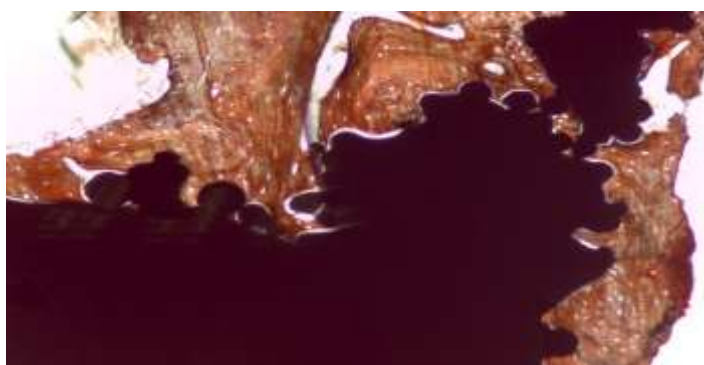


Figura 20

La scansione microradiografica trasversale mostra che, dopo 12 mesi dall'intervento chirurgico, la forma dell'impianto è ancora riconoscibile e che l'osso neoformato si deposita principalmente sulle sue superfici esterne; è possibile, inoltre, rilevare la perfetta integrazione dello scaffold con l'osso trabecolare circostante (figura 21).

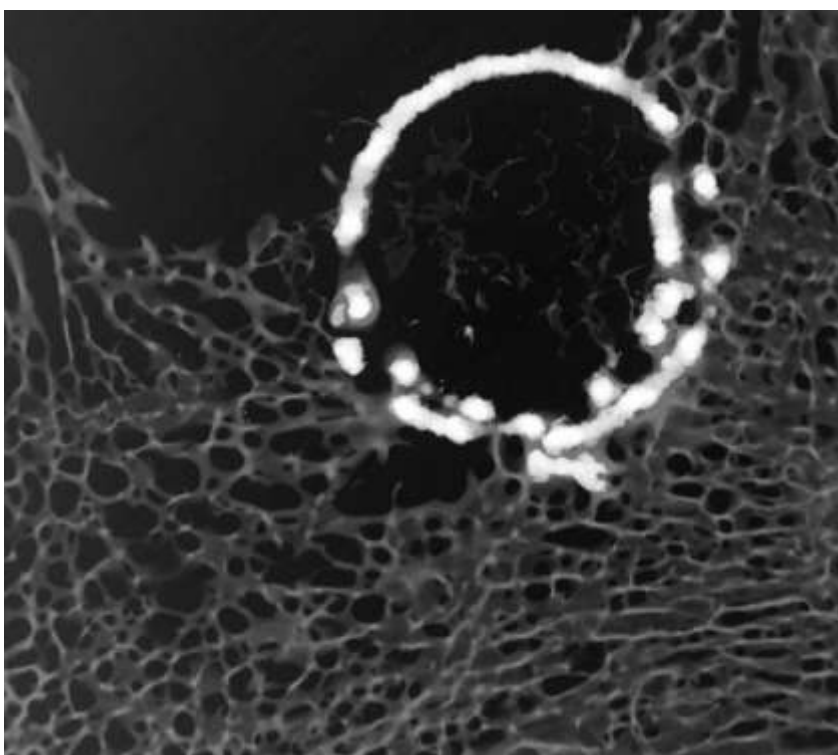


Figura 21

Soggetto N.ro 5

Alla *valutazione radiografica* nelle proiezioni ortogonali, eseguita nell'immediato post-operatorio (**figura 22**), è stato possibile evidenziare un buon posizionamento dello scaffold a livello della metafisi prossimale della tibia.

A 9 mesi dall'impianto (**figura 23**) è stato possibile osservare un'ottima integrazione dello scaffold all'interno del tessuto osseo, in assenza di segni litici peri-materiale, di anomale reazioni periostali e di manifestazioni a carattere infiammatorio a carico del tessuto ospite.



Figura 22



Figura 23

L'*esame Tomografico* ha evidenziato artefatti dovuti al Titanio impiegato per la fabbricazione dello scaffold, sia nell'immediato post-operatorio (**figura 24**) che a 9 mesi dall'impianto.



Figura 24

L'immagine istologica (figura 25), ottenuta con colorazione di Van Kossa, mostra l'interfaccia osso-metallo, in assenza di lesioni osteofitiche o osteolitiche.

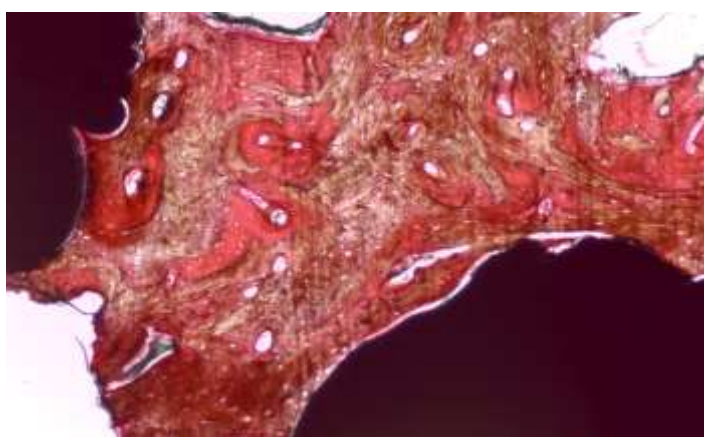


Figura 25

Soggetto N.ro 6

Alla *valutazione radiografica* nelle proiezioni ortogonali, eseguita nell'immediato post-operatorio (**figura 26**), è stato possibile evidenziare un buon posizionamento dello scaffold a livello della metafisi prossimale della tibia.

A 9 mesi dall'impianto (**figura 27**) è stato possibile osservare un'ottima integrazione dello scaffold all'interno del tessuto osseo, in assenza di segni litici peri-materiale, di anomale reazioni periostali e di manifestazioni a carattere infiammatorio a carico del tessuto ospite.



Figura 26



Figura 27

L'*esame Tomografico* ha evidenziato artefatti dovuti al Titanio impiegato per la fabbricazione dello scaffold, sia nell'immediato post-operatorio (**figura 28**) che a 9 mesi dall'impianto.

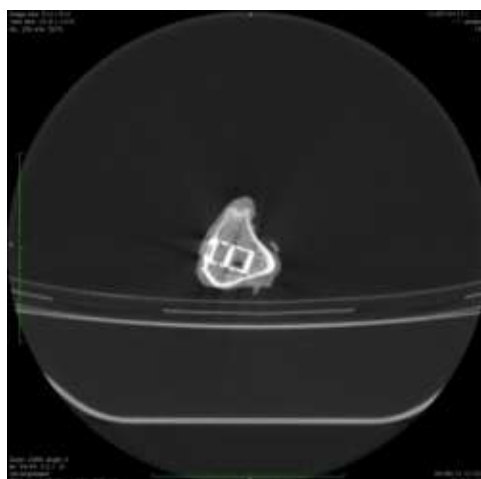


Figura 28

L'immagine istologica (figura 29), ottenuta con colorazione di blu di toluidina, mostra l'interfaccia osso-metallo, in assenza di lesioni osteofitiche o osteolitiche.



Figura 29

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Grazie alle recenti ricerche nel campo dell'ingegneria tissutale e grazie alla maggiore collaborazione tra clinici e ricercatori, l'utilizzo dei biomateriali per la realizzazione di impianti e dispositivi biomedici ha la possibilità di offrire valide soluzioni a problemi di difficile risoluzione, come quelli legati alle gravi perdite di sostanza ossee.

Le gravi perdite di sostanza a carico del tessuto osseo, causate da diverse patologie e da traumi, sono eventi molto comuni in campo ortopedico.

Diversi studi hanno dimostrato che è possibile ottenere buone prestazioni grazie agli *scaffolds*, supporti dotati di specifiche caratteristiche (biocompatibilità, osteointegrazione, osteoconduzione e osteoinduzione) e capaci di favorire l'attacco, l'adesione e la distensione cellulare, con conseguente neodeposizione di tessuto osseo che andrà a colonizzare o rimpiazzare l'impianto artificiale.

Lo *scaffold* ideale risulta essere dotato di una struttura tridimensionale ad elevata porosità capace di garantire proprietà meccaniche e strutturali compatibili con quelle del tessuto osseo. [14, 15, 23]

Gli *scaffolds in titanio* non essendo biodegradabili, ma dotati di bioinerzia e resistenza alla corrosione, rappresentano gli impianti maggiormente idonei alla risoluzione delle gravi perdite di sostanza ossee, in quanto la persistenza del supporto è in grado di conferire stabilità meccanica ed elevata resistenza alle sollecitazioni fisiologiche a livello della sede d'impianto. [18]

In questo studio abbiamo valutato la capacità osteoinduttiva, osteointegrativa e osteoconduttiva di uno *scaffold in titanio* inserito tra i condili tibiali in un modello sperimentale ovino, dal punto di vista radiologico e tomografico.

Dalla valutazione dei risultati ottenuti è stato evidenziato che il biomateriale impiegato non ha prodotto, in nessun caso, reazioni avverse legate alla componente, infezioni o lisi ossee.

Le indagini radiografiche hanno confermato l'assenza di tali modificazioni e l'ottima osteointegrazione del biomateriale all'interno della spongiosa condiloidea.

L'esame tomografico, invece, non ci ha permesso di valutare ulteriormente l'osteointegrazione, l'osteoaduzione, l'osteoaduzione dell'impianto perché il Titanio si è comportato, come peraltro previsto, quale metallo provocando la formazione di artefatti che hanno reso inattendibili i dati ottenuti; dunque non è stato possibile ottenere una valutazione quantitativa in termini di formazione ossea legata o meno alla presenza delle Cellule Staminali Mesenchimali.

Gli esami di microradiografia e di istologia invece, hanno confermato l'ottima osteoaduzione ed osteointegrazione di tutti gli impianti e soprattutto la scarsa tendenza alla biodegradabilità, caratteristica peculiare di altri tipi di scaffolds, come quello in ceramica.[15]

Lo studio è da intendersi comunque come lavoro preliminare in quanto basato su una casistica limitata; riteniamo quindi che lo sviluppo di tali ricerche sarà in

grado di fornire dati più attendibili relativamente all'impiego degli scaffolds associati alle cellule staminali ed al fosfato tricalcico siliconato ai fini dell'osteointegrazione del costruito stesso.

Tutto ciò nella prospettiva d'impiego di uno *Scaffold custom made*, per la risoluzione delle gravi perdite di sostanza, che possa garantire il carico e, contemporaneamente, favorire l'osteorigenerazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Alsberg E., Kong H.J., Hirano Y., Smith M.K., Albeiruti A., Mooney D.J. *Regulating bone formation via controlled scaffold degradation*. Journal of Dental Research (2003); Nov;82(11):903-8
2. Anselme K. *Osteoblast adhesion on biomaterials*. Biomaterials (2000); 21(7), 667-681
3. Atala A., Mooney D.J., Vacanti L.P., Langer R. *Synthetic biodegradable scaffolds*. Birkhauser, Boston MA, (1997)
4. Borsari V., Fini M., Giavaresi G., Rimondini L., Consolo U., Chiusoli L., Salito A., Volpert A., Chiesa R., Giardino R. *Osteointegration of titanium and hydroxyapatite rough surfaces in healthy and compromised cortical and trabecular bone: in vivo comparative study on young, aged and estrogen deficient sheep*. Journal of Orthopaedic Research (2007); 25, 1250-1260
5. Cardellini P., Ciani F., Ciarcia G., Cirotto C., De Santis S., Dini L., Fasulo S., Franceschini V., Labate M., Laforgia V., Longo G., Mauceri A.R., Serra G., Tagliaferro G., Vallarino M. *Citologia e istologia*. (2004)
6. Chen G., Ushida T., Tateishi T. *Scaffold design for tissue engineering*. Macromolecular Bioscience (2002); 2(9), 69-70
7. Frosh K.H., Barvencik F., Viereck V., Lohmann C.H., Dresing K., Breme J. *Growth behavior, matrix production and gene expression of human osteoblasts in defined cylindrical titanium channels*. Journal of Biomedical Materials Research 68 A (2004): 2, 325-334

8. Gunatillake P.A., Adhikari R. *Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering*. European Cells and Materials Journal (2003); 20, 1-16
9. Huth M., Porra F., Schwalb C., Winhold M., Sachser R., Dukic M., Adams J., Fantner G. *Focused electron beam induced deposition: a perspective*. Beilstein Journal of Nanotechnology (2012); 3, 597-619.
10. Hutmacher D.W. *Scaffolds design and fabrication technologies for engineering tissue. State of arts and features prospects*. Journal of Biomaterials Science Polymer Edition (2001); 12, 107-124
11. Li Z., Kawashita M. *Current progress in inorganic artificial biomaterials*. The International Journal of Artificial Organs (2011); 14, 163-170
12. Lu H.H., Subramony S.D., Boushell M.K., Zhang X. *Tissue engineering strategies for the regeneration of orthopedic interfaces*. Annals of Biomedical Engineering (2010); 38, 2142-2154
13. Marin E., Fusi S., Pressacco M., Paussa L., Fedrizzi L. *Characterization of cellular solids in Ti6Al4V for orthopedic implant applications: trabecular titanium*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials (2010); 3, 373-381
14. Mastrogiacomo M., Muraglia A., Komlev V., Peyrin F., Rustichelli F., Crovace A., Cancedda R. *Tissue engineering of bone: search for a better scaffold*. Orthodontics & Craniofacial Research (2005); 8(4), 277-284
15. Mastrogiacomo M., Corsi A., Francioso E., Di Comite M., Monetti F., Scaglione S., Favia A., Crovace A., Bianco P., Cancedda R. *Reconstruction of extensive long bone defects in sheep using resorbable bioceramics based on silicon stabilized tricalcium*. Tissue Engineering (2006); 12(5), 1261-1273

16. Micheletto B. *Patologia chirurgica veterinaria e podologia*.(1980)
17. Monopoli D. *3D biomimetic titanium for personalized patient care*.Canary Islands Institute of Technology – Biomedical Engineering Department (2012)
18. Nomura N. *Artificial organs: recent progress in metals and ceramics*. The International Journal of Artificial Organs(2010); 13, 10-12
19. Ripamonti U., Croocks J., Rueger D.C. *Induction of bone formation by recombinant human osteogenic protein-1 and sintered porous hydroxyapatite in adult primates*. Plastic and Reconstructive Surgery (2001); 107, 977-988
20. Ryan G.E., Pandit A., Apatsidis D.P. *Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications*. Biomaterials (2006); 27, 2651-2670
21. Ryan G.E., Pandit A., Apatsidis D.P. *Porous titanium scaffolds fabricated using a rapid prototyping and powder metallurgy technique*. Biomaterials (2008); 29, 3625-3635
22. Tampieri A., Sprio S., Sandri M., Valentini F. *Mimicking natural biomineralization process: a new tool for osteochondral scaffold development*. Trend in Biotechnology (2011); 29(10), 526-535
23. Tianen H., Lyngstadaas S.P., Ellingsen J.E., Haugen H.J. *Ultra-porous titanium oxide scaffold with high compressive strength*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine (2010); 21, 2783-2792
24. Triffit J.T. *The stem cells of the osteoblast*. In Biliekian J., Raisz L., Rodan G. Eds. Principles of Bone Biology. San Diego, CA, Academic (1996); 39-50

25. Yook S., Jung H., Park C., Shin W., Koh Y., Estrin Y., Kim H. *Reverse freeze casting: a new method for fabricating highly porous titanium scaffolds with aligned large pores*. ActaBiomaterialia (2012); 8, 2401-2410
26. Zippel N., Schulze M., Tobiasch E. *Biomaterials and mesenchymal stem cells for regenerative medicine*. Recent Patents on Biotechnology (2010); 4, 1-22